

論文内容の要旨

論文提出者氏名 入江大介

論文題目

Transplantation of periaortic adipose tissue from angiotensin receptor blocker-treated mice markedly ameliorates atherosclerosis development in apoE^{-/-} mice

論文内容の要旨

近年、異所性脂肪組織の一つである血管周囲脂肪組織(Perivascular adipose tissue: PAT)は多くの血管作動性分子を分泌し血管リモデリングや血管反応性に関与していることが報告されている。また、胸部大動脈周囲脂肪組織(Thoracic periaortic adipose tissue: tPAT)は高脂肪食などの外的刺激により tPAT の表現型が変化する事が報告されている。当研究では高コレステロール食 (high cholesterol diet : HCD) 負荷による tPAT の表現型の変化が動脈硬化進展に及ぼす影響を移植モデルを用いて検討した。

8 週齢の apoE 欠損(apoE^{-/-})マウスに 4 週間もしくは 8 週間の普通食(chow diet: CD)、HCD 負荷を行った。また HCD 負荷と同時に ARB(オルメサルタン 1mg/kg/day)を負荷した場合も検討した。また 8 週齢の AT1a 欠損/apoE 欠損(Agtr1^{-/-}/apoE^{-/-})マウスにも同様に HCD 負荷を行った。また脂肪移植モデルとして 8 週齢の apoE^{-/-}マウスに 8 週間普通食(tPAT-CD)、高コレステロール食(tPAT-HCD)、もしくは高コレステロール食と ARB 負荷を与え(tPAT-HCD/ARB)ドナーとし、16 週齢で tPAT を採取し 12 週間 HCD 負荷した 20 週齢のレシピエント apoE^{-/-}マウスの腹部大動脈腎動脈以下に移植した。また Agtr1^{-/-}/apoE^{-/-}マウスをドナーマウスとして同様に 8 週間の普通食(tPAT-CD/ Agtr1^{-/-}/apoE^{-/-})、高コレステロール食(tPAT-HCD/ Agtr1^{-/-}/apoE^{-/-})を与え、20 週齢の apoE^{-/-}マウスに移植した場合も検討した。移植 4 週後にレシピエントマウスより検体を採取した。レシピエントマウスの弓部大動脈から腹部大動脈分岐部までをオイルレッド O 脂肪染色により en face 解析した。プラークエリアは Scion Imaging にて計測した。血清総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪測定は SRL に外注した。免疫染色は抗マウス Mac2 抗体を一次抗体、Alexa Fluor488 を二次抗体として使用した。核は DAPI にて染色し LSM 510 META 共焦点顕微鏡にて tPAT 内の Mac2 陽性細胞を計測した。tPAT と精巣周囲白色脂肪組織 (epididymal white adipose tissue : WAT) は市販されているトータル RNA 抽出キットと逆転写キットを使用して cDNA とした。RT-PCR は Thermal Cycler Dice を、試薬は SYBR Premix Ex Taq2 を使用した。脂肪組織は 0.04%Tween80 の PBS 内でホモジナイズし 10000G10 分の遠心後に上清を回収した。血清および脂肪組織内 TNF α 、IL-6、アディポネクチン濃度は市販されている ELISA 測定キットを使用して測定した。

4 週間の HCD 負荷ではマウス体重、体重あたりの tPAT と WAT 重量に有意差はなく、組織学的にも明らかな差異を認めなかった。次に mRNA の発現については PPAR γ や FABP4 を含む脂肪分化関連遺伝子の発現が tPAT と WAT とともに著明に亢進した。Angiotensinogen(AGT)、Angiotensin 変換酵素(ACE)、AT1a 受容体(AT1aR)の発現は tPAT において著明に発現が亢進したが、WAT では AGT の発現が著明に抑制された。CD68 と CD206 といった単球/マクロファージマーカーは tPAT において著明に亢進したが WAT では変化は認めなかった。TNF α や IL-6、MCP-1 といった炎症性アディポカインは変化を認めなかった。HCD 負荷と同時に ARB を投与した場合 PPAR γ 、RAS コンポーネント、単球/マクロファージマーカー、炎症性アディポサイトカインの発現は著明に抑制された。Agtr1^{-/-}/apoE^{-/-}マウスにおいては HCD 負荷による tPAT の変化は認めなかった。以上より HCD 負荷により組織特異的に RAS 系コンポーネントの発現が亢進し炎症性細胞の集積が促進されること、この変化には AT1 受容体が深く関与している事が示唆された。tPAT 移植実験においては tPAT-HCD 群の大動脈プラークエリアは tPAT-CD 群と比較して有意に増加した (29%、p<0.01)。一方 tPAT-HCD/ARB 群の大動脈プラークエリアは sham 群、tPAT-CD 群、tPAT-HCD 群に対してそれぞれ 34%、24%、42%抑制された。腎動脈より末梢のプラークエリアは tPAT-HCD 群と tPAT-HCD/ARB 群の間でのみ有意差を認め、一方腎動脈より中枢のプラークエリアは全大動脈のプラークエリアと同様の傾向であった。以上より移植された tPAT は動脈硬化形成において全身的な作用と局所的なパラクライン作用を持つことが示唆された。ドナーマウスを Agtr1^{-/-}/apoE^{-/-}マウスした場合、大動脈プラークエリアは tPAT-CD/ Agtr1^{-/-}/apoE^{-/-}群と比較して tPAT-HCD/ Agtr1^{-/-}/apoE^{-/-}群において有意に抑制された (30%、p<0.01)。腎動脈より中枢側、末梢側に分けてプラークエリアを解析した場合も同様の結果であり、AT1 受容体欠損による動脈硬化抑制は全身的機序によることが示唆された。tPAT-HCD/ARB 群においては tPAT-CD 群、tPAT-HCD 群と比較して血中 TNF α や IL-6 は有意に抑制され、血中アディポネクチン濃度は有意に高値であった。免疫組織染色では tPAT-HCD/ARB 群では tPAT-HCD 群と比較して有意に移植 tPAT 内の Mac2 陽性細胞は少なかった。また移植 tPAT 内の TNF α と IL-6 の mRNA の発現レベルは血中の炎症性サイトカインの結果と同様に tPAT-HCD/ARB 群で有意に抑制されていた。以上より移植された tPAT において TNF α や IL-6 の発現が抑制され、マクロファージの集積が抑制されることにより血中炎症性サイトカインレベルが低下し、結果として tPAT-HCD/ARB 群の動脈硬化が抑制される可能性が示唆された。大動脈周囲脂肪組織特異的な RAS 系の活性化は高コレステロール食負荷を与えた apoE^{-/-}マウスの動脈硬化に関与し、この組織特異的な RAS の活性化を抑制することは全身性炎症を抑制し動脈硬化抑制に作用する。以上より血管周囲脂肪組織は心血管病予防における新しい治療標的となる可能性が示唆された。